



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number: 06217774

(43)Date of publication of application: 09.08.1994

(51)Int.Cl.

C12N 9/88
C12P 19/14
//(C12N 9/88
C12R 1:20)

(21)Application number: 05036889

(71)Applicant:

KIBUN FOOD CHEMIFA CO LTD
KIBUN FOODS INC

(22)Date of filing: 25.02.1993

(72)Inventor:

TAKEUCHI TOSHIO
KUSAKABE ISAO
MURATA KATSUMI

(30)Priority

Priority number: 04325288 Priority date: 04.12.1992 Priority country: JP

(54) NEW ALGINIC ACID DECOMPOSING ENZYME, ITS PRODUCTION AND
POLYMANNURONIC ACID USING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain new enzymes capable of decomposing alginic acid.

CONSTITUTION: Three kinds of these enzymes are the following enzymes: (1) The enzyme cuts polyG and polyMg parts in alginic acid molecule, but does not cut polyM part and optimum pH of the reaction is in the range of 7.5–8.0 and the enzyme is stable at pH5–9. (2) The enzyme cuts every parts of polyG, polyMG and polyM parts and optimum pH of the reaction is 6.5 and the enzyme is stable at pH5–9. (3) The enzyme cuts polyG and polyMG parts, but does not cut polyM part and optimum pH of the reaction is 8.0 and the enzyme is stable at pH4–9. This invention further includes a method for purifying these enzyme and production of polymannuronic acid from alginic acid using these enzymes.

[Date of request for examination]
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998 Japanese Patent Office

[MENU](#)

[SEARCH](#)

[INDEX](#)

[DETAIL](#)

[NEXT](#)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-217774

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 9/88		9359-4B		
C 12 P 19/14		Z 7432-4B		
// (C 12 N 9/88				
C 12 R 1:20)				

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 11 頁)

(21)出願番号	特願平5-36889
(22)出願日	平成5年(1993)2月25日
(31)優先権主張番号	特願平4-325288
(32)優先日	平4(1992)12月4日
(33)優先権主張国	日本 (JP)

(71)出願人	000141510 株式会社紀文フードケミファ 東京都港区新橋3丁目2番5号
(71)出願人	000141509 株式会社紀文食品 東京都中央区銀座7丁目14番13号
(72)発明者	竹内 寿男 東京都東村山市栄町1-4-6 ハイツ久 米川404
(72)発明者	日下部 功 茨城県新治郡出島村大字男神238-55
(72)発明者	村田 克巳 埼玉県狭山市下奥富531-2-905
(74)代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

(54)【発明の名称】 新規アルギン酸分解酵素、その製造方法およびこれを用いたポリマンヌロン酸の製造方法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、アルギン酸を分解する新規な酵素を提供することを目的とする。

【構成】 本発明の3種類の酵素は、1) アルギン酸分子中のポリGおよびポリMG部分を切断するがポリM部分を切断せず、反応の至適pHが7.5~8.0の範囲であり、pH5~9で安定である、2) ポリG、ポリMGおよびポリM部分のいずれをも切断し、反応の至適pHが6.5であり、pH5~9で安定である、および3) ポリGおよびポリMG部分を切断するがポリM部分を切断せず、反応の至適pHが8.0であり、pH4~9で安定である、ことをそれぞれ特徴とする。本発明はまた、これらの酵素の精製方法およびこれらの酵素を用いてアルギン酸からポリマンヌロン酸を製造する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】アルギン酸に作用し、アルギン酸をリーゼン的に脱離分解する酵素であって、アルギン酸分子中のポリGおよびポリMG部分を切断するがポリM部分を切断せず、反応の至適pHが7.5~8.0の範囲であり、pH 5~9で安定であることを特徴とする酵素。

【請求項2】アルギン酸に作用し、アルギン酸をリーゼン的に脱離分解する酵素であって、アルギン酸分子中のポリG、ポリMGおよびポリM部分のいずれをも切断し、反応の至適pHが6.5であり、pH 5~9で安定であることを特徴とする酵素。

【請求項3】アルギン酸分解酵素混合物から請求項1または2記載の酵素を単離する方法であって、フラボバクテリウム属を培養して得られるアルギン酸分解酵素混合物を、濃度5mM以下の、pH 5~7の緩衝液に対して透析し、当該緩衝液で平衡化した陽イオン交換樹脂カラムにより分画する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項4】アルギン酸に作用し、アルギン酸をリーゼン的に脱離分解する酵素であって、アルギン酸分子中のポリGおよびポリMG部分を切断するがポリM部分を切断せず、反応の至適pHが8.0であり、pH 4~9で安定であることを特徴とする酵素。

【請求項5】アルギン酸からポリマンヌロン酸を製造する方法であって、請求項1または4記載の酵素を用いることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アルギン酸分解酵素の粗酵素標品から単離された新規アルギン酸分解酵素、およびその単離方法に関する。さらに本発明は、このアルギン酸分解酵素を用いてアルギン酸からポリマンヌロン酸を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】アルギン酸は、食品工業、化粧品、染色、繊維、水処理などに広く利用されており、さらに、その分解物に植物の生長促進や、人体の腸内における有用細菌であるビフィズス菌の増殖活性等の生理活性を有することが明らかにされている（特開昭63-214120）。近年、自然界に見いだされる多糖類の分解物に様々な生理活性のあることが発見されており、例えば、キチン、キトサン等の分解物およびペクチンの分解物に抗菌活性のあることが認められている。したがって、アルギン酸の分解生成物にもさらに有用な生理活性を持つ化合物が含まれることが期待されており、アルギン酸のオリゴ糖および食物繊維としての利用の研究開発も盛んに行われている（特開平2-303468、特開平2-312542）。

【0003】アルギン酸はグルロン酸およびマンヌロン酸が-1,4-結合したポリマーであり、ポリグルロン酸

という）、グルロン酸マンヌロン酸交互に連なるポリマー（以下ポリMGという）の3つのブロックからなる共重合体である。

【0004】アルギン酸類は一般に高粘度で難分解性であるため、これらの用途に用いる場合、あるいはその後処理や廃液処理に際し、アルギン酸類を分解し低分子化する工業的技術の確立が希求されている。

【0005】アルギン酸を分解して得られるポリMは、現在、アルギン酸の構造研究および抗腫瘍効果の研究に用いられている。さらに、食物繊維性食品や保湿効果を有する化粧品、または医薬品の基材としての用途が期待されているが、従来のポリMの製造法が非常に複雑なため、工業的に生産された例はなく、これらの用途の研究も十分には行われていない。

【0006】従来アルギン酸の分解方法としては、酸、アルカリを用いる方法、あるいは熱および圧力を用いる方法があるが、前者は製品の品質低下や機器の腐食の問題、さらには中和剤の必要性とその後処理等の問題があり、工業的には極めて不利な方法であり、一方後者も分解時間が長くかかり、設備費も高くなるためコストのかかる方法であった。

【0007】これらの方法に対し、近年アルギン酸分解酵素を用いるアルギン酸の酵素分解法が開発された。酵素分解法は、上記方法に比べ穏やかな条件で分解を行うことができ、安全性および装置の腐食の点でより優れた方法ということができる。アルギン酸を分解する酵素としては、基質特異性の異なる複数の酵素が知られており、ポリG、ポリMGおよびポリMのブロックのいずれかに作用しうる酵素およびこれらの複数のブロックに作用しうる酵素がある。本明細書においては、ポリG、ポリMGを切断するがポリMを切断しない酵素をG-ase、ポリM、ポリMGを切断するがポリGを切断しない酵素をM-ase、およびポリG、ポリMG、およびポリMのいずれをも切断する酵素をMG-aseとそれぞれ称する。

【0008】アルギン酸分解酵素を生産する微生物としては、フラボバクテリウム属菌、エンテロバクター属菌（特開平3-94675）、シュウドモナス属菌（特開昭59-143597）およびアルテロモナス属菌（特開昭63-214192）等が知られている。アルギン酸の分解には通常これらの微生物培養液から調製された粗酵素標品、すなわち複数の酵素の混合物が用いられているため、反応の特異性が低い。従って、反応の特異性を高め、反応の制御を容易にするために、かかる粗酵素標品から基質特異性の明らかなアルギン酸分解酵素を単離する安価な方法の開発が求められている。

【0009】一方、ポリMの製造方法としては、従来、アルギン酸の酸加水分解法が知られている。この方法は、アルギン酸を薄酸で100°Cにおいて加水分解した後、pH 2.85においてポリGを沈殿除去し、さらにpH 6.1に下げてポリMを復元する方法である。しか

し、操作が複雑で、かつ、熟練を要するため、工業的な生産方法として用いることは困難である。

【0010】これに対し、上述のG-aseをアルギン酸に作用させると、ポリマンヌロン酸のみを調製することができる。しかし、従来、工業的に得られるG-aseを温湿度条件下でアルギン酸に作用させ、その後pH分画を行うことによりポリMの製造を可能とした例は知られていない。

【0011】従って、アルギン酸からポリMを工業的に製造する、安価で簡便な方法の開発が求められている。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】以上のことから本発明は、工業的に得られるアルギン酸分解酵素の粗酵素標品からG-aseおよびMG-aseをそれぞれ単離し、その諸性質を明らかにすることを目的とする。また本発明は、これらの酵素を安価に収率よく精製する方法を開発することを目的とする。さらに本発明は、得られた酵素を用いてアルギン酸からポリマンヌロン酸およびオリゴマンヌロン酸を製造する方法を開発することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究した結果、特定の条件下で陽イオン交換樹脂を用いることによって、粗酵素標品から2種類のG-aseおよびMG-aseアルギン酸分解酵素をそれぞれ単離精製しうることを見いだし、本発明を完成了。

【0014】本発明は、アルギン酸分解酵素の粗酵素標品から単離された3種類の酵素およびその製造方法を提供するものである。第1および第2の酵素はG-ase(1)、G-ase(2)と称する)であり、第3の酵素はMG-aseである。これらの酵素は、フラボバクテリウム属菌を培養して工業的に得られるアルギン酸分解酵素の粗酵素標品を、まずリン酸緩衝液に対して透析し、次にこれを陽イオン交換樹脂カラムを用いて分画し、さらにクロマトフォカシングカラムクロマトグラフィーおよびゲル通過によって精製して得ることができる。

【0015】本発明において用いるアルギン酸分解酵素の粗酵素標品は、フラボバクテリウム属菌を培養して得られる。フラボバクテリウム属菌としては、例えばフラボバクテリウムマルチボラムK-11(FERM P-11338)を用いることができる。フラボバクテリウムマルチボラムK-11の菌学的性質およびこの菌を培養して工業的に得られるアルギン酸分解酵素(ナガセ生化学工業(株)製)の性質については、特開平4-141090および特開平4-169189にそれぞれ記載されている。

【0016】次に、粗酵素標品から本発明のアルギン酸分解酵素を精製する方法について説明する。

【0017】まずアルギン酸を粗酵素標品と混ぜて

5mM以下、pHが5~7の適当な緩衝液に溶解し、同緩衝液に対して透析する。好ましくは緩衝液のpHは6~6.5であり、例えば1mMのリン酸緩衝液(pH 6~6.5)を用いることができる。

【0018】この標品を同緩衝液で平衡化した陽イオン交換樹脂カラムに吸着させる。陽イオン交換樹脂カラムとしては、一般的に蛋白質の分離精製に用いられる樹脂であればどれを用いてもよいが、疎水度が比較的高いと言われている、CM-TOYOPEARL650M((株)東ソー社製)等のイオン交換樹脂が好ましい。

【0019】この陽イオン交換カラム処理によって、非吸着画分を回収することにより、本発明のポリグルロン酸分解酵素G-ase(2)を得ることができる。

【0020】また、吸着させた後、適当な溶出系を用いて、目的とする酵素G-ase(1)およびMG-aseを含む画分をそれぞれ得ることができる。溶出液系としては、酵素の吸着に用いた緩衝液から順次イオン強度の強い緩衝液をカラムに通すことで酵素蛋白質を分画することができる。また緩衝液のpHを順次上げていくことでも分離することができる。とくに同緩衝液中の0~0.5MNaClの直線濃度勾配によって溶出することが好ましい。

【0021】G-ase(1)またはMG-aseを含む画分はさらに、次の方法により精製する。

【0022】G-ase(1)を含む画分をそれぞれ脱塩後濃縮し、10倍希釈のポリバッファー96-HCl(pH 7.0)で透析した後、25mMエタノールアミン-HCl(pH 9.6)で平衡化されたカラムにのせ、10倍希釈のポリバッファー96-HCl(pH 7.0)で溶出する。分画された酵素画分は、ポリバッファーを含むため、ゲル通過法によりこれを除く。MG-aseを含む画分についても、同様にして精製することができる。

【0023】以上的方法により、本発明のG-aseおよびMG-aseの精製酵素標品をそれぞれ得ることができる。

【0024】本発明のG-aseおよびMG-aseの理化学的性質を以下に述べる。

【0025】G-ase(1)

1. 作用

アルギン酸に作用し、アルギン酸をリーゼ的に分解し、主に不飽和ウロノ酸残基をもつオリゴ糖を生成する。

【0026】2. 基質特異性

ポリG、ポリMGに対し、区別なく働く。

【0027】基質特異性は以下の方法に従って測定した。基質としては、1%ポリM(M%88.5)、1%ポリG:G%92.2)および1%ポリMG(M%57.1)溶液(pH 8.0)を用いた。この基質と本発明による酵素を1:0:1で混合し、反応液を一定時間ごとに300μlずつサンプリングし、TBA反応により生成物を定量した。対照としては、100°C、5分間加熱失活した粗酵素液を用いた。サンプル200μlに0.025NのHClを含む0.125

N H₂SO₄溶液0.25mlを加えて20分間静置し、サンプルの過ヨウ素酸酸化を行った。これに2%の亜ヒ酸ナトリウムを含む0.5NのHCl溶液を加えて2分間静置することにより反応を停止させ、その後、0.3%のチオバルビツール酸溶液を2ml加えて100°Cの湯浴中で10分間加熱し、縮合反応を行った。赤色を呈した反応液は、放冷後、吸光度計により548nmでの吸光度を測定した。ただし吸光度が0.8を越える場合には、酵素反応液を適当に希釈し、TBA反応での吸光度が0.8以下になるようにして測定した。

【0028】また分解生成物については、TLCで生成物の変化を追跡した(展開溶媒はn-ブタノール: ギ酸: 水=4: 6: 1)。

【0029】結果は図1AおよびBに示される。図1AおよびBより、ポリG、ポリMGに対してよく働き、ポリMには働きがないことが示される。不飽和ウロン酸残基を有するオリゴ糖の生成は、3時間でほぼ終了する。ポリGに働きがあると、不飽和ウロン酸を含むグルロン酸のオリゴ糖(2~4糖)が得られる。

【0030】3. 作用pHおよび安定pH(アルギン酸ナトリウムM/G=0.93 1.0%溶液に対して)

図2Aに酵素反応の至適pHが7.5であることが示され、図2Bに安定pHが示される。図2Bにおいて各種のpHで25°C、2時間処理した後の酵素の残存活性はpH 5

~9で60%以上であり、比較的広い範囲で安定であった。

【0031】4. 作用温度および温度安定性

図3Aに示すように、酵素反応の至適温度は40°Cであり、各種温度でpH 6で1時間処理の酵素の残存活性は、40°C以下では、60%以上であった。60°Cではほぼ失活した(図3B)。温度安定性は比較的高いと思われる。

【0032】5. 阻害剤および金属塩の影響

阻害剤による影響は、本酵素をそれぞれ1mM濃度の各種阻害剤で処理したときの残存活性を測定し、未処理の酵素の活性に対する相対値で表わした。表1に示すように、EDTA、PCMB、MIA、TNBS、NBSでそれぞれ阻害が見られた。MIAとNBSで強く阻害されたことから、本酵素の活性には、SH基およびトリプトファン残基が関与していると思われる。またEDTAの存在下で活性がなくなることから、本酵素は金属酵素である。また、金属塩の影響については、酵素をEDTAによって15分間処理した後、各種金属塩を濃度2mMとなるように加えて活性の賦活を調べた。ほとんどの2価金属で活性の賦活が見られた。塩化カドミウム、塩化水銀、塩化バリウム、塩化コバルトについては、活性の賦活効果はなかった。

【0033】

【表1】

表1 G-ase活性に及ぼす阻害剤および金属塩の影響

酵素活性 (%)

阻害剤

EDTA	13.3
PCMB	32.6
MIA	5.81
TNBS	30.9
NBS	0

金属塩

NiCl ₂	73
MnCl ₂	146
CaCl ₂	116
CdCl ₂	75
CuCl ₂	82
PbCl ₂	82
ZnCl ₂	36
AlCl ₃	91
HgCl ₂	9
FeSO ₄	99
FeCl ₃	120
BaCl ₂	4
MgCl ₂	71
CoCl ₂	13

6. 本酵素の分子量

H7: (流速0.5ml/min、検出は280nmにおける吸光度)
セクタクロン-PAGEにより行った。

子量は、41,000であった。また、SDS-PAGEによる分析では、本酵素の分子量は、43,000であった。これにより本酵素は単量体と思われた（図4）。

【0035】7. 本酵素の等電点
等電点電気泳動法により、本酵素の等電点を測定した（LKB Ampholine PAGE plate pH 3.5～9.5, Isoelectric Focusing Calibration Kit（ファルマシア社製））。本酵素の等電点は、8.7であった（図5）。

【0036】8. 本酵素のアミノ酸組成
本酵素のアミノ酸組成を表2に示す。

表2 G-ase(1)のアミノ酸組成
モル%

ASP

THR

SER

GLU

GLY

ALA

VAL

MET

ILE

LEU

TYR

PHE

LYS

HIS

ARG

アミノ酸

12.4

10.2

12.2

7.1

15.2

5.9

8.9

—

5.6

8.0

0.7

3.3

6.7

1.0

2.9

G-ase(2)

1. 作用

アルギン酸に作用し、アルギン酸をリニアゼ的に分解し、不飽和ウロニ酸残基をもつオリゴ糖を生成する。

【0039】2. 基質特異性

ポリG、ポリMGに対し働き、ポリMには働きかない。

【0040】基質特異性は、上述と同様にして測定した。結果は図6AおよびBに示される。図6AおよびBより、ポリG、ポリMGに対してよく働き、ポリMには働きないことが示された。ポリG、ポリMGからは不飽和ウロニ酸を含むオリゴ糖が得られ、ポリGに働きると、不飽和ウロニ酸を含むグルコン酸のオリゴ等が得られる。

【0041】3. 作用pHおよび安定pH（アルギン酸ナトリウムM/G=0.93 1.0%溶液に対して）

図7Aに酵素反応の至適pHが8.0であることが示され、図7Bに安定pHが示される。図7Bにおいて各種のpHで25°C、2時間処理した後の酵素の残存活性はpH 4～9で60%以上であり、比較的広い範囲で安定であった。

【0042】MG-ase

1. 作用

【0037】アミノ酸組成の分析は日立アミノ酸アナライザ-835型-50を用いて行った。サンプルは、加水分解用ガラス試験管に精製酵素700μgを加え、さらに6NHClを0.5ml加え、脱気後封管し、110°C、24時間酸加水分解を行った。その後、エバポレーターで塩酸を除去した後、蒸留水を加えて溶解し、アミノ酸アナライザを用いてアミノ酸組成を分析した。

【0038】

【表2】

し、不飽和ウロニ酸もしくは不飽和ウロニ酸残基をもつオリゴ糖を生成する。

【0043】2. 基質特異性

ポリM、ポリG、ポリMGに対し、区別なく働く。

【0044】基質特異性は、上述と同様にして測定した。結果は図8AおよびBに示される。図8AおよびBより、ポリM、ポリG、ポリMGに対してよく働き、ポリMには働きないことが示された。不飽和ウロニ酸残基を有するオリゴ糖の生成は、3時間でほぼ終了する。

【0045】このことにより、本酵素はアルギン酸を完全に分解することができる。

【0046】3. 作用pHおよび安定pH（アルギン酸ナトリウムM/G=0.93 1.0%溶液に対して）

図9Aに酵素反応の至適pHが6.5であることが示され、図9Bに安定pHが示される。図9Bにおいて各種のpHで25°C、2時間処理した後の酵素の残存活性はpH 5～9で60%以上であり、比較的広い範囲で安定であった。

【0047】4. 作用温度および温度安定性

図10Aに示すように、酵素反応の至適温度は40°Cであり、各種温度でpH 6で1時間処理の酵素の残存活性は、40°C以下では、60%以上であった。60°Cではほぼ失

れる。

【0048】5. 阻害剤および金属塩の影響

阻害剤による影響は、本酵素をそれぞれ1 mM濃度の各種阻害剤で処理したときの残存活性を測定し、未処理の酵素の活性に対する相対値で表わした。表1に示すように、SDS、MIA、TNBS、NBSでそれぞれ阻害が見られた。MIAとNBSで強く阻害されたことから、本酵素の活性に

は、SH基およびトリプトファン残基が関与していると思われる。また、金属塩の影響については、酵素をEDTAによって15分間処理した後、各種金属塩を濃度2 mMとなるように加えて活性の賦活を調べた。本酵素の活性は、塩化水銀、塩化鉛など重金属で強く阻害された。

【0049】

【表3】

表3 MG-ase活性に及ぼす阻害剤および金属塩の影響

酵素活性 (%)

阻害剤

SDS	3.0
MIA	0.5
TNBS	43.5
NBS	2.5

金属塩

NiCl ₂	72
MnCl ₂	57
CaCl ₂	120
CdCl ₂	88
CuCl ₂	74
PbCl ₂	1.1
ZnCl ₂	53
AlCl ₃	121
HgCl ₂	7
FeSO ₄	81
FeCl ₃	93
BaCl ₂	82
MgCl ₂	73
CoCl ₂	68

6. 本酵素の分子量

本酵素の分子量の測定は、HPLCゲル通過（カラム：Protein Pak300 × 2 Waters社製、0.1Mリン酸緩衝液（pH 7）、流速0.5ml/min、検出：280nmにおける吸光度）およびSDS-PAGEにより行った。

【0050】HPLCゲル通過による分析では、本酵素の分子量は、33,000であった。また、SDS-PAGEによる分析では、本酵素の分子量は、32,000であった。これにより本酵素は単量体と思われた（図11）。

【0051】7. 本酵素の等電点

等電点電気泳動法により、本酵素の等電点を測定した（LKB Ampholine PAGE plate pH 3.5~9.5、Isoelectric Focusing Calibration Kit（ファルマシア社製））。本酵素の等電点は、8.2であった（図12）。

【0052】8. 本酵素のアミノ酸組成

本酵素のアミノ酸組成を表4に示す。

【0053】アミノ酸組成の分析は上述の方法に従ったが、300 μgの精製酵素を用いて行った。

【0054】

【表4】

アミノ酸

ASP	13.8
THR	6.6
SER	8.9
GLU	12.0
GLY	9.3
ALA	8.0
VAL	4.4

LEU	5.1
TYR	4.0
PHE	5.8
LYS	9.7
HIS	16.6
ARG	2.6

次に、本発明の酵素を用いたポリMおよびオリゴMの製造方法について説明する。

【0055】まず、アルギン酸を0.1MNaClを含む水もしくは適当な緩衝液に溶解し、37°Cに加温する。pHを約8に調整した後、本発明のポリグルロン酸分解酵素G-ase(2)を加え、37°Cで10~24時間反応させる。

反応後、0.1NHClを加えてpH2.85とし、沈殿のないことを確認する。次に、pHを1.5に下げて沈殿物を得る。これを0.1MNaClを含む希HClで2回洗浄した後、水に懸濁し、希アルカリで中和する。ここに過剰量のエタノールを滴下して沈殿物を得る。この沈殿物をエーテルで脱水し、減圧下で乾燥してポリMを得る。

【0056】このようにして得られたポリMをNMRにより分析し、また、M/G(マンヌロン酸/グルロン酸)比をGCスペクトル分析によって測定した。アルギン酸分子中のM/G比は、モリス(E.R.Morris)らの方法(Carbohydrate Research, 81 (1989) 305-314)に従って計算した。その結果、本発明に従って得られたポリMは、酸加水分解およびpH分画法によって得られたポリM(ハウグ(Haug)らの方法(Acta Chemica Scandinavia 21 (1967) 691-704)による)と同等の理化学的性質を示すことが確認された。

【0057】本発明の方法によれば、反応溶液中のアルギン酸の初期濃度を高くすることによって、ポリMの調製効率を高めることができる。例えば、以下の実施例5に示されるように、アルギン酸の初期濃度を1%から10%まで変化させても、ポリMの回収率はほとんど変化しない。すなわち、本発明の方法は、反応に用いられる装置のスケールアップをすることなく、大量のポリMを調製することができるという利点を有している。

【0058】得られたポリMは、さらにM-aseまたはMG-aseで処理することによって、オリゴMを得ることができる。この反応には、M-ase活性を有しない周知のいずれのアルギン酸分解酵素を用いることができる。

【0059】

【実施例】

(実施例1) G-ase(1)の精製

12gの粗酵素を600mlの1mMリン酸緩衝液(pH6.6)に溶解し、同緩衝液に対して透析した。遠心分離して沈殿を除いた後、上清を同緩衝液で平衡化したCM-TOYOPEARL 650Mカラム(Φ2.6×38cm、約200ml)にアプライし、流速120ml/hr、0M~0.5MNaClのリニアグラジェント溶出を行った。10mlずつ分画し、分画番号19~25を集めた。限外濾過濃縮を行った後、1/10濃度polybuffer-HCl(pH7)で平衡化し、Chromatofocusingカラム(Φ1.3×30、Ethanolamine-HCl(pH9.6)で平衡化)にアプライした。溶出は、1/10濃度polybuffer-HCl(pH7.0)、流速30ml/hrで行い、5mlずつ分画して分画番号19~25を集めた。これを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した後、0.24MNaClを含む40mMリン酸緩衝液(pH6.7)に溶解した。同緩衝液で平衡化したUltratogel AcA-54ゲル濾過カラム(Φ1.6×85、bed vol.170ml)を用いて流速15ml/hrでゲル濾過を行い、3mlずつ分画して分画番号3~5を集めた。約5mgの酵素蛋白質を得た。回収率は8.5%、精製倍率は30倍であった。

Cl(pH7)で平衡化して、Chromatofocusingカラム(Φ1.3×30、Ethanolamine-HCl(pH9.6)で平衡化)にアプライした。溶出は、1/10濃度polybuffer-HCl(pH7.0)、流速30ml/hrで行い、この操作を2回行った。5mlずつ分画して分画番号21~23を集めた。これを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した後、0.24MNaClを含む40mMリン酸緩衝液(pH6.7)に溶解した。同緩衝液で平衡化したUltratogel AcA-54ゲル濾過カラム(Φ1.6×85、bed vol.170ml)を用いて流速15ml/hrでゲル濾過した。3mlずつ分画して分画番号33~38を集めた。約18mgの酵素蛋白質を得た。回収率は17%、精製倍率は17倍であった。

【0060】(実施例2) G-ase(2)の精製

12gの粗酵素を600ml、1mMリン酸緩衝液(pH6.6)に溶解し、同緩衝液に対して透析した。遠心分離して沈殿を除いた後、上清を同緩衝液で平衡化したCM-TOYOPEARL 650Mカラム(Φ2.6×38cm、約200ml)にアプライして流速120ml/hrで同緩衝液を流した。クロマトグラフィーは280nmにおける吸光度が0.1以下になるまで行い、同樹脂に対する非吸着画分を得た。得られた非吸着画分は、ポリMに対して働かず、ポリG、ポリMGに対して働いたことからG-aseであることが示された(図7AおよびB)。回収率は16.8%、精製倍率は0.25倍であった。

【0061】(実施例3) MG-aseの精製

12gの粗酵素を600ml、1mMリン酸緩衝液(pH6.6)に溶解し、同緩衝液に対して透析した後、遠心分離して沈殿を除いた。上清を同緩衝液で平衡化したCM-TOYOPEARL 650Mカラム(Φ2.6×38cm、約200ml)にアプライし、流速120ml/hr、0M~0.5MNaClのリニアグラジェント溶出を行った。10mlずつ分画し、分画番号39~46を集めた。限外濾過濃縮を行った後、1/10濃度polybuffer-HCl(pH7)で平衡化し、Chromatofocusingカラム(Φ1.3×30、Ethanolamine-HCl(pH9.6)で平衡化)にアプライした。溶出は、1/10濃度polybuffer-HCl(pH7.0)、流速30ml/hrで行い、5mlずつ分画して分画番号29~32を集めた。これを蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した後、0.24MNaClを含む40mMリン酸緩衝液(pH6.7)に溶解した。同緩衝液で平衡化したUltratogel AcA-54ゲル濾過カラム(Φ1.6×85、bed vol.170ml)を用いて流速15ml/hrでゲル濾過を行い、3mlずつ分画して分画番号3~5を集めた。約5mgの酵素蛋白質を得た。回収率は8.5%、精製倍率は30倍であった。

【0062】(実施例4) G-ase(2)によるポリMの製造

アルギン酸ナトリウム ($M/G = 1.75$) 10g を 0.1M NaCl を含む蒸留水 1L に溶解し、pH を 7.2 に調整した。このアルギン酸溶液を酵素を加える前に 37°C に加温した。このアルギン酸溶液に実施例 2 で得られた G-ase(2) 溶液を 325mL 加えて、酵素反応を行わせた。この時の酵素量は 175.8 単位であった。酵素の活性測定は 1.0% アルギン酸ナトリウム溶液と酵素液を 1:1 の割合で混合し、37°C で 30 分間反応を行い、100°C で 5 分間処理して反応を停止させた後、TBA 反応を用いて不飽和鎖を定量することにより行った。1 単位は、1 分間に 1 μmol の β -ホルミルピルビン酸を生成する酵素量とした。

【0063】アルギン酸ナトリウム溶液の G-ase による処理は、24 時間行った。酵素処理後、100°C で 10 分間加熱処理し、放冷後、0.1N HCl で pH を 2.85 まで下げた。沈殿が生じないことを確認した後 (ポリ G が存在した場合、沈殿が生じる)、さらに 0.1N HCl を加えて pH を 1.5 に調整した。4°C で一晩静置した後、遠心分離によって沈殿を得た。得られた沈殿を 0.1M NaCl を含む希塩酸で洗浄した後、水に懸濁し、希アルカリで中和した。この溶液 75mL を 200mL のエタノール中に滴下し、

アルギン酸ナトリウム 初期濃度 (%)	ポリ M 重量 mg	回収率 %	M 含有率 %
1	33.3	13.3	92.60
3	101.1	13.5	90.63
5	178.7	14.3	89.89
10	393.6	15.7	91.80

以上のことから、アルギン酸ナトリウムの初期濃度を高くすることにより、装置のスケールアップをすることなく、ポリ M の調製効率を高めることが可能であることが示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1AはG-ase(1)の基質特異性を示すグラフであり、図1BはG-ase(1)の基質特異性を示すTLCの結果である。

【図2】図2AはG-ase(1)の作用pHを示すグラフであり、図2BはG-ase(1)の安定pHを示すグラフである。

【図3】図3AはG-ase(1)の作用温度を示すグラフであり、図3BはG-ase(1)の温度安定性を示すグラフである。

【図4】図4は、G-ase(1)のSDS-PAGEによる分子量測定結果を示す。

【図5】図5は、G-ase(1)の等電点電気泳動法による等電点測定結果を示す。

沈殿物を得た。この沈殿物をエーテル処理により脱水し、減圧下で乾燥した。

【0064】アルギン酸 10g から 2g のポリ M が得られた (M 含有率 92%)。

【0065】(実施例5) G-ase(2)によるポリ M の製造におけるアルギン酸濃度の影響

アルギン酸ナトリウム ($M/G = 0.94$) を、アルギン酸ナトリウム濃度がそれぞれ 1%、3%、5% および 10% となるように、0.1M NaCl を含む蒸留水に溶解し、溶液体量を 25mL とした。0.01N NaOH を用いてこの溶液の pH を 7.0-8.0 に調整し、酵素を加える前に 37°C に加温した。このアルギン酸溶液に実施例 2 で得られた G-ase (2) 溶液をアルギン酸ナトリウム 1g あたり 16U となるように加えた。酵素反応および反応溶液からのポリ M の回収は、実施例 4 に記載の方法にしたがって行った。

【0066】表5に、得られたポリ M の重量、回収率およびマンヌロン酸含有率を示す。

【0067】

【表5】

【図6】図6AはG-ase(2)の基質特異性を示すグラフであり、図6BはG-ase(2)の基質特異性を示すTLCの結果である。

【図7】図7AはG-ase(2)の作用pHを示すグラフであり、図7BはG-ase(2)の安定pHを示すグラフである。

【図8】図8AはMG-aseの基質特異性を示すグラフであり、図8BはMG-aseの基質特異性を示すTLCの結果である。

【図9】図9AはMG-aseの作用pHを示すグラフであり、図9BはMG-aseの安定pHを示すグラフである。

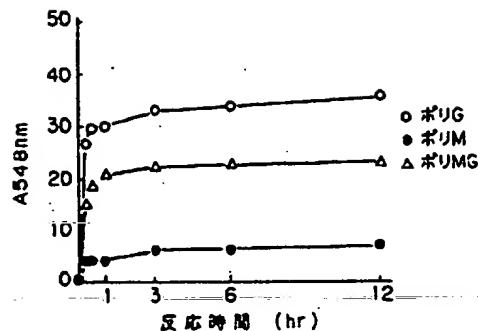
【図10】図10AはMG-aseの作用温度を示すグラフであり、図10BはMG-aseの温度安定性を示すグラフである。

【図11】図11は、MG-aseのSDS-PAGEによる分子量測定結果を示す。

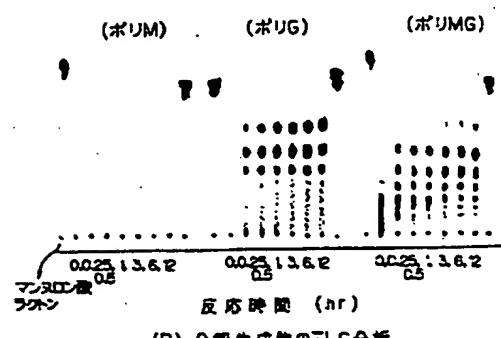
【図12】図12は、MG-aseの等電点電気泳動法による等電点測定結果を示す。

【図1】

G-ase (1) の基質特異性



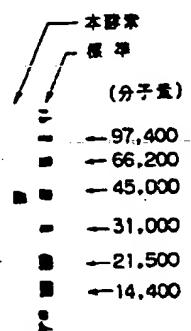
(A) 分解生成物のTBA反応による分析



(B) 分解生成物のTLC分析

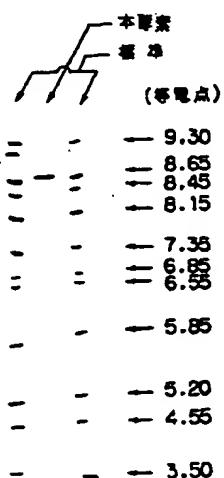
【図4】

G-ase(1)のSDS-PAGEによる分子量の測定

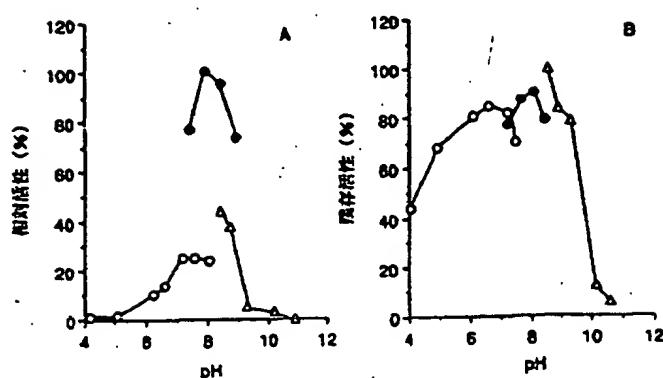


【図5】

G-ase(1)の等電点電気泳動法による等電点の測定



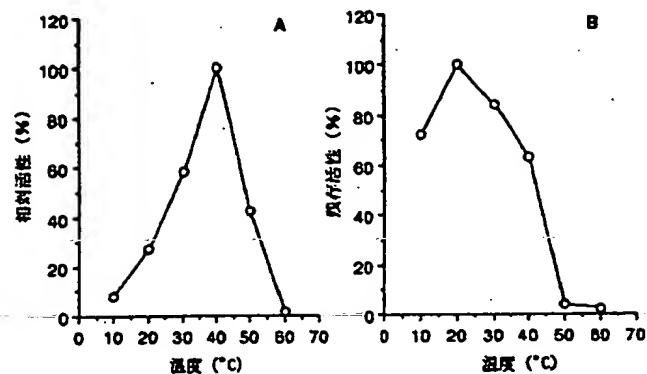
【図2】



G-ase (1) のpHによる影響

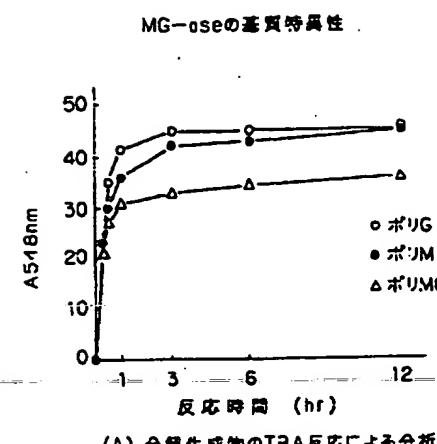
A, G-aseの作用pH; B, G-aseのpH安定性
 ○, McIlvaine buffer ; □, Tris-HCl buffer ; △, Atkins-Pantin buffer

【図3】

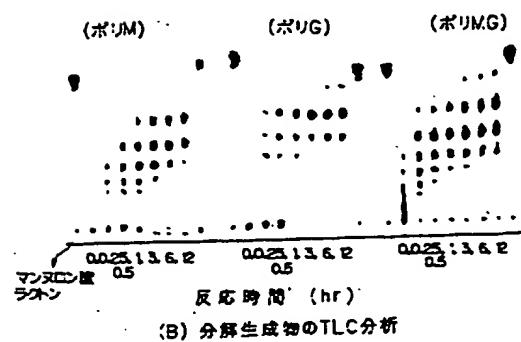
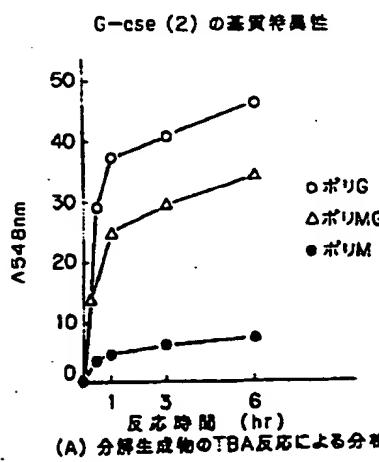


G-ase (1) の温度による影響
 A, G-ase (1) の作用温度; B, G-ase (1) の温度安定性

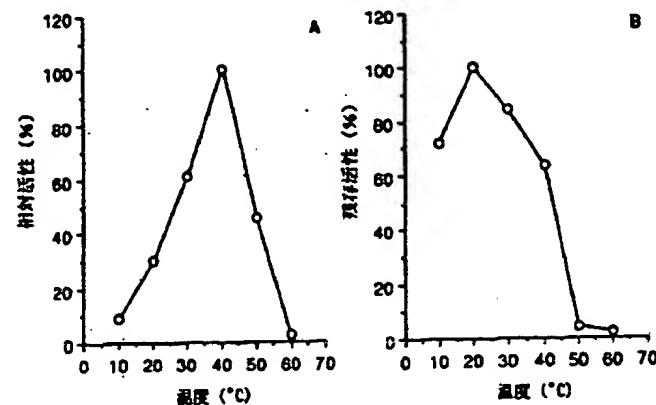
【図8】



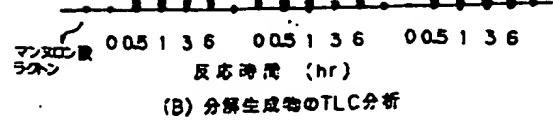
【図6】



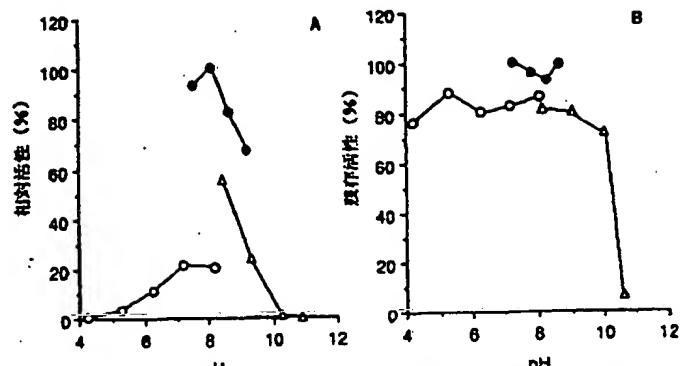
【図10】



MG-aseの温度による影響
 A, MG-aseの作用温度; B, MG-aseの温度安定性



【図7】



G-ase(2)のpHによる影響

A, G-ase(2)の作用pH : B, G-ase(2)のpH安定性
○, McIlvaine buffer : ●, Tris-HCl buffer ; △, Atkins-Pantin buffer

【図9】

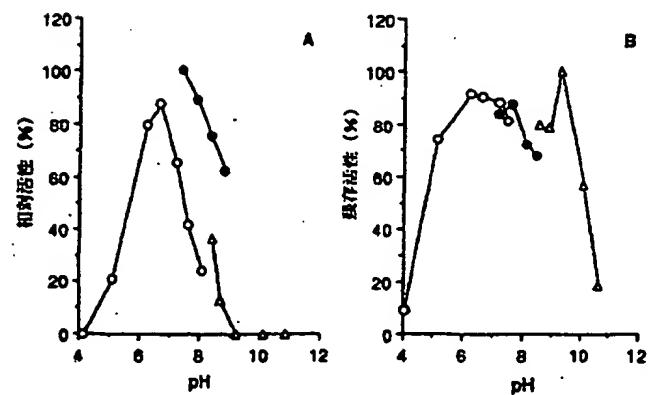
【図11】

MG-aseのSDS-PAGEによる分子量の測定

本酵素
標準
(分子量)

- 97,400
- 66,200
- 45,000
- 31,000
- 21,500
- 14,400

【図12】



MG-aseのpHによる影響

A, MG-aseの作用pH : B, MG-aseのpH安定性
○, McIlvaine buffer : ●, Tris-HCl buffer ; △, Atkins-Pantin buffer

MG-aseの等電点電気泳動法による等電点の測定

本酵素
標準
(等電点)

- 9.30
- 8.65
- 8.45
- 8.15
- 7.35
- 6.85
- 6.55
- 5.85
- 5.20
- 4.55
- 3.50